

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal**

**Luana Martins dos Santos**

**DIVERSIDADE MICROBIANA EM SUBSTRATOS DESCARTADOS DURANTE AS  
FASES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIIS DE EUCALIPTO**

**DIAMANTINA/MG**

**2016**

**LUANA MARTINS DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE MICROBIANA EM SUBSTRATOS DESCARTADOS DURANTE AS  
FASES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales  
do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

**DIAMANTINA/MG  
2016**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

S237d Santos, Luana Martins dos  
Diversidade microbiana em substratos descartados durante as fases do processo de produção de mudas clonais de eucalipto / Luana Martins dos Santos. – Diamantina, 2017.  
46 p. : il.

Orientador: Marcelo Luiz de Laia

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. 2016.

1. PCR-RFLP. 2. Oligonucleotídeo. 3. Similaridade. 4. Patologia Florestal. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

**CDD 634.973**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**LUANA MARTINS DOS SANTOS**

**DIVERSIDADE MICROBIANA EM SUBSTRATOS DESCARTADOS DURANTE AS  
FASES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIS DE EUCALIPTO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal dos Vales  
do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para  
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia

Aprovada em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Dr. Ronnie Von dos Santos Veloso  
Universidade Federal de Viçosa – UFV

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Miranda Titon  
Faculdade de Ciências Agrárias - UFVJM

---

Prof. Dr. Reynaldo Campos Santana  
Faculdade de Ciências Agrárias - UFVJM

---

Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia  
Faculdade de Ciências Agrárias – UFVJM

**DIAMANTINA/MG  
2016**

Aos meus pais, Irineu e Elenita.

Dedico

## **AGRADECIMENTOS**

Acima de tudo a Deus por toda força, por iluminar meu caminho, tornando tudo possível.

A minha família em especial meus pais pelo o companheirismo e incentivo em todas as etapas de minha vida e por ser meu alicerce.

A Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Marcelo Luiz de Laia pela confiança e compreensão, além da valiosa colaboração para minha formação pessoal e profissional, sendo para mim um exemplo de pessoa a ser seguido.

A Janaina, Luciana e Tarcísio pelo o apoio e auxílio para realização deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, que contribuíram para minha formação, dedicando-se em fornecer seus conhecimentos. E a todos os funcionários do Departamento de Engenharia Florestal.

A todos do Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal, pelo apoio, convívio, momentos de descontração, enfim por tudo.

À UFVJM e Capes pela concessão da bolsa.

Aos amigos, pessoas especiais, pelos momentos de descontração e apoio.

A todos que de alguma forma colaboraram para realização deste trabalho.

Muito obrigada!!!!

## RESUMO

A produção de muda é uma etapa primordial e decisiva para a implantação de uma floresta. No entanto, devido a diversos fatores de ordem técnica, as perdas no setor de produção são bastante relevantes. Dentre estes fatores está o descarte do substrato, que quando feito de forma errônea favorece a proliferação de micro-organismos fitopatogênicos em viveiro. Isso pode desencadear em perdas significativas e ainda se tornar um passivo ambiental. Raramente o substrato é reutilizado nos viveiros comerciais, uma vez que presume-se que as características física, química e biológicas foram perdidas durante a produção das mudas. Contudo, há poucos estudos sobre micro-organismos em substratos. A importância deste estudo fundamenta-se na escassez de pesquisa sobre essa problemática que afeta o setor de produção de mudas, bem como buscar alternativas sustentáveis que pressupõe a demanda de uso desse insumo. A aplicação de técnicas moleculares vem sendo empregadas para detectar e identificar os micro-organismos em diversos ambientes. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi detectar a diversidade microbiológica em amostras de substratos descartados pela técnica de PCR-RFLP. Foram coletados dez amostras de substratos em diferentes viveiros no estado de Minas Gerais em diferentes fases de produção e estado de tecnificação. O DNA genômico total foi extraído e amplificado pela técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos para fungos, bactéria e archaea. Os produtos amplificados foram submetidos à clivagem com enzimas de restrição *HaeIII*, *BamHI*, *TaqI* e *HindIII*, para detecção de possíveis polimorfismos entre as amostras por meio da técnica de PCR-RFLP. Foi possível verificar diferenças entre as amostras de substratos, tanto em relação ao tamanho da região do DNA amplificada, bem como em relação à presença de sítios de restrição. Com base no índice de similaridade, detectou-se uma maior variação da diversidade dentro da amostra em diferentes fases do que nas amostras entre os diferentes viveiros. Portanto, estes resultados podem ser relevantes para o conhecimento da diversidade microbiológica em substrato. Porém mais estudos se fazem necessários para maior compreensão destes micro-organismos e sua função no substrato.

Palavras-chave: PCR-RFLP; Oligonucleotídeo; Similaridade, Patologia Florestal.

## **ABSTRACT**

The production of changes is a crucial and decisive step for the implementation of a forest. However, due to several technical factors, losses in the production sector are quite relevant. Among these factors is the disposal of substrate, which when done wrongly favors the proliferation of phytopathogenic microorganisms in nursery. This can trigger significant losses and still become an environmental liability. Rarely the substrate is reused in commercial nurseries, since it is assumed that the physical, chemical and biological characteristics were lost during the production of seedlings. However, there are few studies on microorganisms on substrates. The importance of this study is based on the scarcity of research on this issue that affects the production of seedlings, as well as seek sustainable alternatives that assumes the use of this raw material demand. The application of molecular techniques have been employed to detect and identify microorganisms in various environments. In this context, the objective of this study was to detect microbiological diversity in substrate samples dropped by PCR-RFLP technique. Ten samples were collected of substrates in different nurseries in the State of Minas Gerais in different stages of production and State of modern farms. Total genomic DNA was extracted and amplified by the PCR technique with specific oligonucleotides to fungi, bacteria and archaea. The amplified products were submitted to cleavage with HaeIII restriction enzymes, BamHI, HindIII, and TaqI for detection of possible polymorphisms between the samples by PCR-RFLP technique. It was possible to check differences between samples of substrates, both in relation to the size of the amplified DNA region as well as in relation to the presence of restriction sites. Based on the index of similarity, if a greater variation of diversity within the sample at different stages than in samples between different nurseries. Therefore, these results may be relevant to the knowledge of microbiological diversity in substrate. However more studies are needed to better understanding of these microorganisms and their role in the substrate.

**Key words:** PCR-RFLP; Oligonucleotide; Similarity, Forest Pathology.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Amostras de substratos coletados em diferentes fases de produção. A – substrato da área de descarte; B – substrato da área de expedição/3ª seleção; C – substrato *in natura*; D – substrato de mudas da 1ª seleção; E – substrato de mudas da 2ª seleção. Fonte: Oliveira, 2014. ....22

**Figura 2** - Perfil eletroforético, em gel de agarose a 0,8%, de amostras de DNA genômico extraídas de micro-organismos presentes em amostras de substrato para produção em mudas de eucalipto. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). (1 e 6). Substrato velho na área de descarte; (2 e 7) área de expedição/3ª seleção; (3 e 8) substrato *in natura* pronto para uso; (4 e 9); substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); (5 e 10) substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).....27

**Figura 3** - Imagem de gel de agarose à 1,5% contendo produtos de PCR. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria (produto de PCR com os iniciadores 63f/1087r); Rhizobactéria (produto da PCR utilizando os iniciadores 63f/Rhiz1244r); Fungo (produto da PCR utilizando os iniciadores ITS1f/ITS4r). Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de substrato área de expedição/3ª seleção; 3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).....29

**Figura 4** - Imagem de gel de agarose à 1,5% contendo produtos de PCR. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Archaea- Produto de PCR utilizando iniciadores Ar3f/AR927r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de substrato área de expedição/3ª seleção; 3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias). ....30

**Figura 5** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *HaeIII*. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria - iniciadores 631087r; Rhizobactéria -

iniciadores 63f/Rhiz 1244r; Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).....32

**Figura 6** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *Bam*HI. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria iniciadores 63f/1087r; Rhizobactéria-iniciadores 63f/Rhiz 1244r; Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).....33

**Figura 7** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *Taq*I. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria - iniciadores 63f//1087r; Rhizobactéria-iniciadores 63f/Rhiz 1244r; (C) – Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).....34

**Figura 8** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *Hind*III. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria - iniciadores 63f/1087r; Rhizobactéria - iniciadores 63f/Rhiz 1244r; Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de

área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias). .....35

**Figura 9** - Agrupamento das amostras de substrato obtido por meio do método UPGMA aplicado sobre a matriz de dissimilaridade de Jaccard. 1 e 6 amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 amostras de substrato área de expedição/3ª seleção; 3 e 8 amostra de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 amostras de substratos 2ª seleção(60 a 70 dias). .....37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Amostras de substratos coletados em diferentes fases de produção.....	23
<b>Tabela 2</b> - Oligonucleotídeos iniciadores (Singh et al., 2006) utilizados nas PCR com o intuito de detectar a diversidade microbiana existente nas amostras de substrato de mudas em diferentes fases de produção. ....	25
<b>Tabela 3</b> - Enzimas de restrição utilizadas nas análises de PCR-RFLP. O traço sublinhado indica a posição onde a enzima corta a sequência de DNA. ....	25

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	15
2.1 PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIIS DE EUCALIPTO .....	15
2.2 SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE MUDAS .....	16
2.3 DIVERSIDADE MICROBIANA .....	17
2.4 MÉTODOS MOLECULARES PARA ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA .....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
3.1 LOCAL DE ESTUDO .....	22
3.2 AMOSTRAS DE SUBSTRATO .....	22
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL .....	23
3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO .....	24
3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	24
3.6 ANÁLISE DE POLIMORFISMO POR MEIO DE PCR-RFLP .....	25
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS .....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA DO SUBSTRATO .....	27
4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) .....	28
4.3 ANÁLISE DE POLIMORFISMO POR MEIO DE PCR-RFLP .....	31
5. CONCLUSÕES .....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40

## 1. INTRODUÇÃO

A eucaliptocultura é um dos segmentos mais importante no setor florestal. Atualmente, ocupam 5,56 milhões de hectares no país, o que representa 71,9% do total. Estima-se que com o aumento da população e do consumo *per capita*, a demanda por produtos florestais, principalmente madeira para uso industrial e geração de energia, chegará a 5,2 bilhões de m<sup>3</sup>/ano, o que exigiria o plantio adicional de cerca de 210 milhões de hectares de eucalipto em todo o mundo, considerando os níveis atuais de produtividade (IBÁ, 2015).

Para suprir essa demanda, a produção de mudas visando quantidade e qualidade, representa uma das fases de extrema importância. Pode-se dizer que é considerada determinante, já que é a primeira etapa de um processo para implantação de uma floresta, um empreendimento de longo prazo. A cultura do eucalipto é intensiva e baseada em plantios florestais formados por mudas clonadas de alta produtividade. A técnica mais utilizada para produção de mudas de eucalipto é a miniestaquia, por permitir a otimização do enraizamento e qualidade da muda clonal (ALFENAS et al, 2004; XAVIER et al., 2009).

A produção de mudas de eucalipto clonal é feita em métodos avançados em todo o seu processo, desde a produção dos propágulos vegetativos até a expedição das mudas. No entanto, um dos principais fatores que contribui para o insucesso na produção das mudas é a sanidade do viveiro. A incidência de doenças, juntamente com o manejo inadequado tem causado perdas significativas na produção de mudas. Essas perdas chegam a mais de 25%, mesmo em viveiros mais tecnificados (ALFENAS et al., 2009; FARIA, 2013; OLIVEIRA, 2014). Neste contexto, Alfenas et al. (2009), enfatizam a importância de medidas simples de higiene e manejo que vise a eliminação de fonte de inóculo e redução das condições favoráveis de incidência de doença. Fatores como agrupamento de mudas, eliminação de tecidos vegetais tenros, substratos e mudas mortas sobre o canteiro e o piso do viveiro, bem como evitar a irrigação excessiva, podem diminuir parcialmente ou totalmente o aparecimento e desenvolvimento de doenças neste ambiente.

Atualmente o descarte das mudas mortas e de restos de substrato vem sendo feita de forma questionável. As mudas descartadas ficam durante todo o processo de seleção próximas a mudas sadias e o substrato das mesmas é acumulado em algum canto no viveiro, até obter-se uma quantidade considerável para ser transportados para área de descarte. A permanência desses descartes no viveiro pode-se tornar uma fonte de inóculo nocivo, favorecer a disseminação de micro-organismos fitopatogênicos, além de promover perdas econômicas significativas. Mais, esse amontoado de descarte pode torna-se um passivo ambiental (GONÇALVES et al., 2013).

No substrato, existe, normalmente, grande número de micro-organismo, que podem ser benéficos, neutros ou fitopatogênicos. Os micro-organismos fitopatogênicos têm sido objeto de vários estudos, em virtude de sua capacidade de interferir nos processos fisiológicos da planta, ou seja, causar doença. Podem ser transmissíveis de uma planta para outra ou por meio de disseminadores, como o vento, água, substrato, etc. (ALFENAS, et al., 2009).

Sendo o substrato determinante para a produção de mudas, o mesmo deve apresentar características físico-químicas e biológicas adequadas, com baixa densidade, estabilidade volumétrica boa porosidade, elevada capacidade de CTC, boa aeração e drenagem, isento de pragas, micro-organismos fitopatogênico e plantas invasoras além de ser de fácil preparo e de baixo custo (KRAZT, 2011). Devido a essas características desejáveis, raramente tem-se reutilizado substratos descartados em viveiros comerciais, pois presume-se que essas característica foram perdidas e há presença de organismos patogênicos.

A identificação e caracterização de micro-organismos em substratos descartados se torna fundamental para a eliminação parcial ou total de micro-organismos fitopatogênico e para controle de doença em viveiro, além de possibilitar a reutilização do mesmo.

Avanços das técnicas de biologia molecular propiciaram o desenvolvimento e emprego de vários métodos moleculares (DESTRO, 1995) baseados, principalmente, na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que permite a identificação de micro-organismos em baixa população em curto período de tempo (ELEY, 1993; MESQUITA *et al.*, 2001). Além da PCR, outra técnica complementar pode ser utilizada para a detecção diversidade dentre amostras de micro-organismo, a RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphisms”). Essas duas técnicas utilizadas conjuntamente são chamadas de PCR-RFLP. Após a amplificação do DNA por meio do uso da PCR, os fragmentos de DNA produzidos são clivados com uma ou mais enzimas de restrição, gerando fragmentos de DNA que podem ser diferentes, devido às variações nucleotídicas existentes entre os indivíduos de uma mesma espécie, ou entre espécies de indivíduos diferentes. Essa diferença é dita polimorfismo. Em alguns casos, esse padrão de polimorfismo pode ser considerado um *fingerprint* genético de uma determinada espécie (BALINI, et al., 2015).

Por fim, PCR-RFLP é uma metodologia barata, rápida e segura, comparada com técnicas de sequenciamento de ácidos nucleicos.

Portanto, o objetivo deste estudo foi detectar a diversidade de micro-organismos em amostras de substratos descartados em viveiros pela técnica de PCR-RFLP.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 PRODUÇÃO DE MUDAS CLONAIIS DE EUCALIPTO

O setor florestal brasileiro tem crescente relevância para o país, contribuindo com grandes parcelas no âmbito econômico, ambiental e social. Por exemplo, esse setor é estratégico para o abastecimento de matéria-prima e produtos para a exportação e benefício intangível (sombra, fixação de carbono, etc), de maneira direta, para a conservação e preservação dos recursos naturais (ABRAF, 2013), dentre outros.

A eucaliptocultura tem destacada importância neste setor por ser a atividade florestal de maior expressão econômica no país, sendo destinado a diversas finalidades de matéria-prima florestal, tais como para os setores de papel e celulose, carvão vegetal, madeira para serraria, postes e mourões, painéis reconstituídos e móveis (BRACELPA, 2016). Os plantios de eucalipto ocupam 5,56 milhões de hectares da área de árvores plantadas no país, e estão situados principalmente nos Estados de Minas Gerais (25,2%), São Paulo (17,6%) e Mato Grosso do Sul (14,5%) (IBÁ, 2015).

O Eucalipto é originário da Oceania, pertence à família Myrtaceae e possui cerca de 700 espécies descritas. Atualmente, chama-se, popularmente, de Eucalipto árvores ou arbustos pertencentes à espécies dos gêneros *Eucalyptus*, *Corymbia* e *Angophora* (PARRA-O. et al., 2009; WILSON et al., 2005). Devido sua capacidade de adaptação, aliada ao rápido crescimento e alta qualidade da madeira, tem impulsionado a sua rápida adoção para o plantio florestal de interesse econômico nas zonas tropicais e subtropicais do globo (VENTURIN, et al., 2014; MYBURG et al., 2014).

A fim de obter o máximo de produção, com uma excelente homogeneidade da material, quanto à qualidade, atualmente os plantios tem sido realizados com mudas clonais. A clonagem do eucalipto iniciou-se em 1975 na Republica Popular do Congo, África, e foi introduzida no Brasil na década de 70 (MAFIA et. al., 2005). Além de maximizar a produção e a qualidade da madeira, a clonagem mantém as características genéticas desejáveis da espécie-mãe e permite a multiplicação de genótipos resistentes à doenças e pragas (VENTURIN et al., 2014; ALFENAS, et al., 2009).

Uma das maneiras de se obter mudas clonais é a miniestaquia. Trata-se de um processo de enraizamento de estacas que pode ser do segmento caulinar, obtidas de material selecionado. Essa é a metodologia mais utilizada nas grandes empresas florestais que obtêm as estacas nos minijardins clonais. (XAVIER et al., 2009; ALFENAS et al., 2009). De acordo com Alfenas, et al. (2004), é importante analisar a boa sanidade das mudas, ausência de doenças no caule, nas folhas e raízes, o



estado nutricional, a formação do sistema radicular, com raízes novas e bem distribuídas e possuir uma boa rustificação.

No entanto, a produção de mudas clonais pelo método de miniestaquia requer um viveiro bem tecnificado, o que requer razoável investimento. Viveiros de mudas clonais de eucalipto mais simples podem enfrentar diversos problemas quanto à qualidade na padronização dos procedimentos, problemas que podem gerar a má formação do sistema radicular, menor qualidade e menor sobrevivência das mudas. Esses aspectos podem ser influenciados também por fatores como: a qualidade da água utilizada na irrigação, a nutrição das mudas, o substrato utilizado como meio de enraizamento, as embalagens (tubetes e bandejas) e as máquinas utilizadas na lavagem e desinfecção das mesmas (ALFENAS et al., 2004).

## **2.2 SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE MUDAS**

O substrato é um insumo de extrema importância no processo de produção de mudas nas mais diversas cadeias produtivas, de diferentes culturas vegetais de interesse econômico, podendo se tornar a chave de sucesso ou fracasso em um sistema de cultivo (KAMPF, 2002). É um material usado como meio de crescimento de planta, sendo o substituto do solo na produção de muda (BRASIL, 2004; KAMPF, 2000).

A prática do cultivo de plantas em recipientes, preenchidos com misturas que substitua o solo, já era utilizada há muito tempo. As primeiras misturas de substrato datam de 1941, na Califórnia, após várias tentativas de viveiristas que produziam plantas em recipientes preenchidos com solo mineral, surgindo à mistura de areia com serragem de sequoia para a produção de plantas em viveiros (BOOMAN, 2000). No entanto, somente após a 2ª Guerra Mundial se difundiu o interesse na pesquisa com substratos, realizada principalmente para atender às necessidades da emergente indústria desse insumo (VAN DIJK e VAN DER BOON, 1971). No Brasil, as pesquisas começaram na década de 70 (MINAMI, 2000).

O substrato é um importante fator de influencia no processo de produção de mudas, principalmente nas fases iniciais da vida da planta, onde diferentes formulações garantem mudas de boa qualidade, desde que sejam fornecidas água e nutrientes em quantidades adequadas (DUARTE e NUNES, 2012). O substrato deve garantir o desenvolvimento de uma planta com qualidade, em curto período de tempo e baixo custo (CUNHA et al., 2006), sendo sua principal função de sustentar a muda e fornecer condições adequadas para o desenvolvimento e funcionamento do sistema radicular, assim como os nutrientes necessários ao desenvolvimento.

Os principais tipos de substrato podem ser compostos por um único material, ou pela combinação de diferentes tipos de materiais (WENDLING; GATTO, 2002). Entretanto, se justifica o uso de, no máximo, três componentes em uma mistura (GONÇALVES et al., 2000), devido os custos de produção. Uma maior quantidade de componentes inviabilizaria, economicamente, a produção (DUTRA, 2010). Preferencialmente, os componentes da mistura para composição do substrato devem ser produzidos no viveiro ou adquiridos em empresas especializadas. Estes materiais podem ter diversas origens, ou seja, animal, vegetal, mineral e artificial (BEZERRA e BEZERRA, 2000).

As características físicas dos substratos são uma das mais importantes, visto que as mesmas não podem, facilmente, ser modificadas. Firmino e Kampf (2012) ressaltam a importância de conhecer as propriedades físicas dos componentes de substratos, o que permitirá direcioná-los para as necessidades da planta. Segundo Kampf (2008), as características físicas indispensáveis para a caracterização fundamental do material podem ser resumidas em: densidade volumétrica, porosidade e capacidade de retenção de água. A partir dessas propriedades é possível indicar a qualidade e sugerir usos e limitações dos substratos.

Com relação às propriedades químicas, estas podem ser manuseadas pelo técnico com mais facilidade do que as características físicas (SCHORN; FORMENTO, 2003). Os problemas mais comuns na produção de mudas se referem às condições de acidez excessiva do substrato, seja atuando sobre as plantas, diretamente causando injúrias, ou, indiretamente, afetando a disponibilidade de nutrientes e atividade de micorrizas, ou aumentando a infecção por alguns patógenos (SANTOS et al., 2000). Além disso, o substrato também deve apresentar adequada capacidade de troca catiônica (CTC) e qualidade sanitária.

Além das características físicas e nutricionais adequadas, as características biológicas do substrato são de suma importância, uma vez que os micro-organismos atuam na decomposição da matéria orgânica, alterando a disponibilidade de nutrientes para as plantas, e, ao mesmo tempo, influenciam as propriedades físicas do solo, como a estabilidade dos agregados (SIQUEIRA et al., 1994). Também influenciam diretamente no ciclo dos principais nutrientes (CARNEIRO, 1995). O substrato deve ser isento de sementes de plantas invasoras, pragas e micro-organismos fitopatogênicos (ABREU, et al, 2002; GONÇALVES et al., 2000).

## **2.3 DIVERSIDADE MICROBIANA**

A diversidade e atividade da microbiota influenciam diretamente nas várias características do substrato, tais como a agregação de suas partículas, a disponibilidade de determinados nutrientes,

a aeração e o armazenamento de água. Isso acaba refletindo no desenvolvimento da muda e, posteriormente, da planta. Em alguns casos, os micro-organismos presentes no substrato podem causar sérias doenças às mudas. Exemplos de fitopatógenos que pode causar sérios danos em viveiros são fungos do gênero *Pythium*, *Cylindrocladium*, *Rhizoctonia*, dentre outros (ALFENAS, et al., 2009). Devido a isso, pesquisas têm como objetivo aumentar a produção, reduzir o uso de produtos químicos e contribuir para alcançar um padrão de mudas mais sustentáveis (SANDRA RIETH, 2012).

Os micro-organismos ocorrem em praticamente todos os ambientes. E com o advento de técnicas moleculares, essa diversidade microbiana tem sido o centro de vários estudos, especialmente nas ultimas décadas (COUTINHO et al., 1999; ROSADO, 2000; TIEDJE et al., 2001). A existência e a diversidade de seres vivos no planeta estão intimamente ligadas à diversidade e à atividade metabólica de micro-organismos na natureza. Eles fazem parte do solo e substrato de maneira indissociável, sendo responsáveis por inúmeras reações bioquímicas, como: decomposição e ressíntese da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes e fixação biológica do nitrogênio. Também atuam na produção de substâncias promotoras ou inibidoras do crescimento de plantas e ação antagônica a patógenos. A microbiota do solo age também nos processos de intemperismo das rochas, desempenhando papel fundamental na gênese do solo (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Dentre os grupos de micro-organismos responsáveis pelos processos de decomposição da matéria orgânica destacam-se as bactérias, os fungos e os actinomicetos. Devido à ampla diversidade, as grandes populações ao longo da história evolutiva, os micro-organismos vêm contribuindo fortemente para riqueza e a complexidade das interações entre os organismos do solo, incluindo desde simbiose altamente específica a mutualismos difusos (BEARE et al., 1995).

Os micro-organismos variam dentro e entre os diferentes tipos e condições de solos, sendo o grupo das bactérias mais numerosas. Com relação à diversidade funcional dos organismos do solo e substrato é, ainda, bastante elevada, ocorrendo, até mesmo, entre espécies do mesmo gênero e apresentam alta diversidade metabólica, o que os tornam bem versáteis para ocupação dos diversos nichos ecológicos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Nesse contexto, Stursa et al., (2009) enfatizam que a diversidade dos micro-organismos é tão ampla quanto desconhecida. Um grama de solo pode conter 10 bilhões de micro-organismos, representando milhares de espécies. O número de espécies microbianas identificadas cresce a cada ano, sendo descritos mais de 70.000 fungos, 30.000 protozoários, 26.000 algas, 6.500 bactérias e 1.000 vírus. Esses números são, no entanto, pequenos

diante do total de espécies, estimado em cerca de dois milhões. Isso significa que foram descobertas e nomeadas, talvez, menos de 0,1% e no máximo 10% das espécies microbiana, dependendo do habitat estudado (ROSSELÓ-MORA e AMMAN, 2001; STURSA, 2009).

Apesar da sua grande importância ecológica, menos de 1% dos micro-organismos presentes no solo são cultiváveis. Portanto, a maior parte da diversidade microbiana dos solos ainda não está mapeada e caracterizada (TORSVIK e OVREAS, 2002). Esses mesmos dados podem estar relacionados com o substrato.

## **2.4 MÉTODOS MOLECULARES PARA ANÁLISE DA DIVERSIDADE MICROBIANA**

Os micro-organismos podem ser estudados por metodologia dependente ou independente de cultivo. Os métodos dependentes de cultivos são conhecidos por sua seletividade e não representa a real diversidade existente (AMANN et al., 1995). Estes métodos podem limitar, seriamente, a avaliação taxonômica e filogenética microbiana devido à falha no cultivo da maioria dos micro-organismos pelos métodos convencionais (PACE, 1997).

Como alternativas aos métodos em que o cultivo de micro-organismos é empregado, foram desenvolvidas várias técnicas, dentre as quais se destacam aquelas baseadas em ferramentas moleculares. Estas podem ser de extração, amplificação e análise de sequência de DNA diretamente da amostra de solo ou substrato, sem a necessidade de isolamento e cultivo dos micro-organismos (TORSVISK et al, 1998) *in vitro*.

Os métodos moleculares receberam grande impulso com o desenvolvimento da técnica conhecida como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A PCR é um método de amplificação, *in vitro*, de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, proposto por Kary Mullis, em 1987. A PCR permite a amplificação de sequências específicas de ácido desoxirribonucleico (DNA) por meio da ação da enzima *Taq* DNA polimerase e de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) sobre um DNA molde. A PCR é conduzida em um equipamento automatizado e computadorizado, denominado termociclador, o qual alterna as temperaturas por determinados períodos de tempo, possibilitando a ocorrência de ciclos repetitivos de desnaturação e síntese de DNA (KONEMAM, et al., 2001). A característica principal dessa técnica é amplificar exponencialmente cópias do material genético a partir de pouca quantidade dele (MESQUITA et al., 2001).

PCR tem sido utilizada com muita frequência em diagnóstico microbiológico nos últimos anos (MALORNY et al., 2003), permitindo uma alta especificidade e aplicabilidade com centenas de métodos descritos (MESQUITA et al., 2001).

Os produtos de PCR permitem analisar a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana, tanto para ambiente aquático, quanto terrestres. A partir da técnica de PCR, vários outros métodos derivaram dela, como por exemplo, DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), TGGE (*Temperature Gradient Gel Electrophoresis*); PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*); ARDRA (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*); T-RFLP (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*); RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) e Caracterização por Microsatélites (KIRK et al, 2004), dentre outras.

Entre estes métodos, a técnica PCR-RFLP baseia-se na amplificação de uma sequência de DNA por meio da técnica PCR seguida de uma restrição do fragmento de DNA por endonucleases. Essas enzimas clivam a molécula de DNA previamente amplificada em sítios específicos, gerando perfis de restrição (VOLPINI et al., 2004; ROTUREAU et al., 2006). Assim, essa técnica gera fragmentos de restrição que podem ser diferentes, o que possibilita a detecção de variações nucleotídicas existentes entre indivíduos de uma mesma espécie ou entre indivíduos de espécies diferentes. O resultado é a presença de diferentes fragmentos de restrição, que podem servir como um *fingerprint* genético de uma determinada espécie (BALINI, et al, 2015).

Assim, estas técnicas, PCR e PCR-RFLP, podem ser utilizadas para taxonomia de fungos, por meio da amplificação da região Espaçador Transcrito Interno (ITS) do DNA Ribossomal (rDNA) bem como para taxonomia de bactérias e archaea, por meio da amplificação de regiões do gene Ribossomal 16S. A região ITS está localizada entre os genes 18S rDNA e 28S rDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (HILLIS e DIXON, 1991). Essa região ITS é dividida em duas: ITS1 (espaço intergênico entre os genes 18S e o 5.8S) e ITS2 (espaço intergênico entre os genes 5.8S e 28S) (HILLIS e DIXON, 1991; SCHLOTTERER et al., 1994). Os genes ribossomais são altamente conservados dentro de uma espécie. Por outro lado, as regiões intergênicas ITS, por não codificar para nenhum gene, evoluem mais rapidamente, podendo apresentar variações intraespecificamente tanto na sequência de bases quanto no comprimento da região (Gerbi, 1985). Por esse motivo, essas sequências servem para a taxonomia de espécies e gêneros (Schlotterer et al., 1994; Antonioli et al., 2000; Gomes et al., 2002). Do mesmo modo, as sequências de 16S rDNA se tornaram padrão na determinação de relações filogenéticas, na avaliação da diversidade em amostras ambientais e na detecção e quantificação de populações específicas (HEAD et al., 1998) em bactérias e archaea. O 16S rRNA possui 9 regiões variáveis, alternadas com regiões conservadas, denominadas de V1 a V9. Estas regiões podem ser utilizadas

para determinação de filogenia (WOESE et al., 1983 e DAMS et al., 1988) e diversidade microbiana. Áreas variáveis, normalmente, são utilizadas para determinar as relações evolutivas entre dois organismos muito próximos (mesma espécie, às vezes). Já as regiões conservadas desse gene podem elucidar relações evolutivas distantes, de tempos remotos, entre duas moléculas de rRNA 16S.

Com isso, a diversidade de micro-organismos em uma dada amostra poderá ser observada por meio do uso dessas técnicas.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO

O estudo foi conduzido no Laboratório de Genética e Biotecnologia Florestal (LGBF), do Departamento de Engenharia Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM), em Diamantina, Minas Gerais.

#### 3.2 AMOSTRAS DE SUBSTRATO

Amostras de substratos de mudas clonais de eucalipto foram coletadas em dois viveiros florestais localizados no estado de Minas Gerais, que possuem capacidade para produzir mais de 50 milhões de mudas por ano em diferentes fases de produção (Figura 1). Os substratos avaliados possuíam a seguinte composição: A- 45% de vermiculita (VM), 45% de fibra de coco (FC), 10% de Mecplant® (Mec), e B- 50% de vermiculita (VM) mais 50% de casca de arroz carbonizada (CAC).



**Figura 1** - Amostras de substratos coletados em diferentes fases de produção. A – substrato da área de descarte; B – substrato da área de expedição/3ª seleção; C – substrato *in natura*; D – substrato de mudas da 1ª seleção; E – substrato de mudas da 2ª seleção. Fonte: Oliveira, 2014.

Para obter amostras representativas de diferentes fases do processo de produção, coletou-se amostras composta de substratos em diferentes estágios de desenvolvimento das mudas (Tabela 1).

**Tabela 1-** Amostras de substratos coletados em diferentes fases de produção.

Etapas	Tempo	Coletas	
Área de descarte	110-360 dias	Substrato proveniente de todo tipo de descarte, armazenado no viveiro até que se dê o destino final do mesmo.	
3ª seleção	100-110 dias	Coletados em vários canteiros	
Substrato <i>in natura</i>	60-70 dias	Material pronto para uso coletado imediatamente antes do estaqueamento (testemunha).	
	1ª seleção	35-45 dias	Coletados em vários canteiros
	2ª seleção	60-70 dias	Substrato proveniente de todo tipo de descarte, armazenado no viveiro até que se dê o destino final do mesmo.

Estas amostras foram coletadas em substrato pronto para uso (durante o processo de enchimento dos tubetes) e em tubetes, onde as mudas não se desenvolveram adequadamente e/ou estavam senescentes (mudas que possuíam deformação foliar, menor número de folhas, aspectos visuais de ataque por doenças, severa deficiência nutricional visual). Cada amostra foi composta por substrato de 100 tubetes de 55 cm<sup>3</sup> de volume. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer à -20°C no Laboratório de Silvicultura.

### 3.3 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

As extrações do DNA total de micro-organismos presentes nas amostras de substrato foram realizadas utilizando-se o conjunto de reagentes FastDNA® SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals), seguindo as instruções do fabricante. Basicamente, o método consiste em lisar as células dos micro-organismos presentes nas amostras. A partir de 0,25g de substrato, em um tubo de polipropileno contendo grânulos de sílica, após adição de 978 µL de tampão de fosfato de sódio e 122 µL de tampão MT, a lise celular ocorre por meio de ação química (compostos acima) e por meio de ação mecânica (agitação vigorosa em Vórtex modelo Genie, fabricado pela empresa MO BIO, Laboratories, Inc.). Por meio de centrifugação a 9.680 rpm, por 15 minutos, a temperatura ambiente, as impurezas foram precipitadas e o sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo de polipropileno estéril. A fim de remover as proteínas, 250 µL de solução de precipitação de proteínas, tampão PPS, foram adicionados, homogeneizando-se as amostras, por inversão por 10 vezes, e centrifugadas a 9.680 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado, transferido para um novo tubo de polipropileno estéril de 15 ml e a ele adicionado 1 ml do Binding Matrix Superior. A amostra foi misturada por inversão durante 2 minutos e, posteriormente, o tubo foi deixado em repouso por 3 minutos, a temperatura ambiente. Após o período de precipitação a temperatura ambiente, retiraram-se 500 µL do sobrenadante, tomando o cuidado para não capturar impurezas



precipitadas no fundo do tubo, transferindo-os para um tubo contendo um filtro (resina). Esse tubo com resina foi centrifugado, por 1 minuto, para a que a solução passasse através da resina. O filtrado foi descartado. O DNA extraído fica retido na resina. Em seguida, o tubo anterior foi novamente agitado, posto a descansar em temperatura ambiente e repetiu-se o processo de passagem pela resina. Esse procedimento foi realizado até todo o sobrenadante fosse passado pela coluna de resina. Após, 500 µL de solução de lavagem de sais, SEWS-M, foi adicionada à coluna de resina e submetida à centrifugação a 9.680 rpm, por 2 minutos, para a retirada de sais das amostras. O DNA, preso à resina, foi eluído por meio da adição de 50 µL da solução DES, sob centrifugação por 1 m. Ao final, as amostras foram mantidas a -80°C até o momento de uso.

### **3.4 QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO**

A concentração do DNA extraído de micro-organismos presentes nas amostras foi estimada com o auxílio de um espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda Bio), medindo-se a absorbância nos comprimentos de onda 260 e 280 nm. O equipamento fornece a quantidade de DNA em cada amostra, em nanogramas (ng)

A qualidade das amostras de DNA extraído foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 0,8%. Foi utilizado tampão TAE 1X (Tris -acetato, EDTA, pH 8,0) adicionado de 2,0 µg/mL de brometo de etídio ao gel.

Uma alíquota (5 µL) de cada uma das amostras de DNA foi misturada a uma alíquota (1 µL) de *loading dye* (tampão de carregamento, 0,025% de azul de bromofenol e 50% de glicerol). O corante permite visualizar à corrida e o glicerol serve para que o DNA, em solução, não fique “boiando” na superfície do gel e se perca. Um padrão (1 Kb DNA Ladder, Fermentas Inc) de peso molecular e de concentração foi aplicado no primeiro pocinho do gel a fim de poder estabelecer comparações futuras.

A eletroforese foi realizada por 2 h a 70 V. O gel foi visualizado sob luz UV, em transiluminador, e fotodocumentada em um fotodocumentador (Loccus Biotecnologia Transluminator L. Pix) acoplado a um microcomputador.

### **3.5 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)**

A caracterização molecular das amostras de DNA obtidas a partir de substrato foi realizada por meio de amplificações de regiões específicas do DNA por PCR, segundo o protocolo proposto por Sinhg, et al., (2006). As amostras de DNA genômico foram amplificadas com pares de oligonucleotídeos iniciadore (Tabela 2) específico para bactérias, fungos e archaea.

As PCR foram realizadas em solução contendo: 5 µL de tampão para PCR 10X, 2 µL MgCl<sub>2</sub> 25 mM; 4 µL de dNTP 250 µM; 0,5 µL de enzima *Taq* DNA polimerase 5 U/µL; 1 µL de cada um dos oligonucleotídeos 63f, 1087r, Rhiz-63f, 1244r ou 2 µL de cada um dos oligonucleotídeos ITS1f/ITS4r, Ar3f/Ar927r; 2 µL de cada uma das amostras de DNA e água Tipo I esterilizada para volume final de 50 µL. As reações foram conduzidas em um termociclador automático MyCycler (BioRAD) programado para as seguintes condições: um passo inicial de 95°C por 5 m seguido por 30 ciclos composto por 95°C por 30 s, 55° C por 30 s e 72°C por 1 m. Após o final dos ciclos, um passo a 72°C por 10 minutos foi adicionado. Em seguida, as amostras foram mantidas a 4° até a retirada das amostras do termociclador.

Uma alíquota de 5 µL de cada reação amplificada foi analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE 1X, conforme procedimentos descritos na seção anterior. As imagens dos géis de agarose foram fotodocumentados e armazenados em computador, para posterior análise.

**Tabela 2-** Oligonucleotídeos iniciadores (Singh et al., 2006) utilizados nas PCR com o intuito de detectar a diversidade microbiana existente nas amostras de substrato de mudas em diferentes fases de produção.

Primer	Sequência (3'-5')	Especificidade	Região alvo	Referências
63f	AGGCCTAACACATGCAAGTC	Eubacteria	16S	MARCHESI. et al (1998)
1087r	CTCGTTGCGGGACTTACCCC	Eubacteria	16S	HAUBEN et al., (1997)
Ar3f	TTCCGGTTGATCCTGCCGGA	Archaea	16S	GIOVANNONI et al (1988)
AR927r	CCCGCCAATTCCTTTAAGTTTC	Archaea	16S	JURGENSE et al., (1997)
ITS1f	CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA	All fungi	ITS	GARDES et al., (1993)
ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC	All fungi	ITS	WHITE et al (1990)
Rhiz-1244r	CTCGCTGCCCACTGTCAC	Rhizobia/ agrobacteria	16S	TOM-PETERSEN et al. (2003)

### 3.6 ANÁLISE DE POLIMORFISMO POR MEIO DE PCR-RFLP

Após as amplificações de regiões do DNA das amostras por meio da técnica de PCR, cada uma das amostras amplificadas foi submetida à clivagem com as enzimas de restrição *Hae*III, *Taq*I, *Bam*HI e *Hind*III (Termo Scientific) (Tabela 3).

Cada reação de clivagem foi composta por 2 U de cada enzima de restrição, 16 µL do produto de PCR (DNA amplificado) e 2 µL do tampão da respectiva enzima, para um volume final de 20 µL. Cada reação de clivagem foi mantida a 37°C por 3 horas e analisada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5% com as mesmas condições descritas na seção anterior.

**Tabela 3 -** Enzimas de restrição utilizadas nas análises de PCR-RFLP. O traço sublinhado indica a posição onde a enzima corta a sequência de DNA.

Enzimas	Sítio de corte	Tampão
<i>Hae</i> III	GG_CC	1X buffer R
<i>Taq</i> I	T_CGA	1X buffer <i>Taq</i> I
<i>Bam</i> HI	G_GATCC	1X buffer <i>Bam</i> HI
<i>Hind</i> III	A_AGCTT	1Xbuffer R

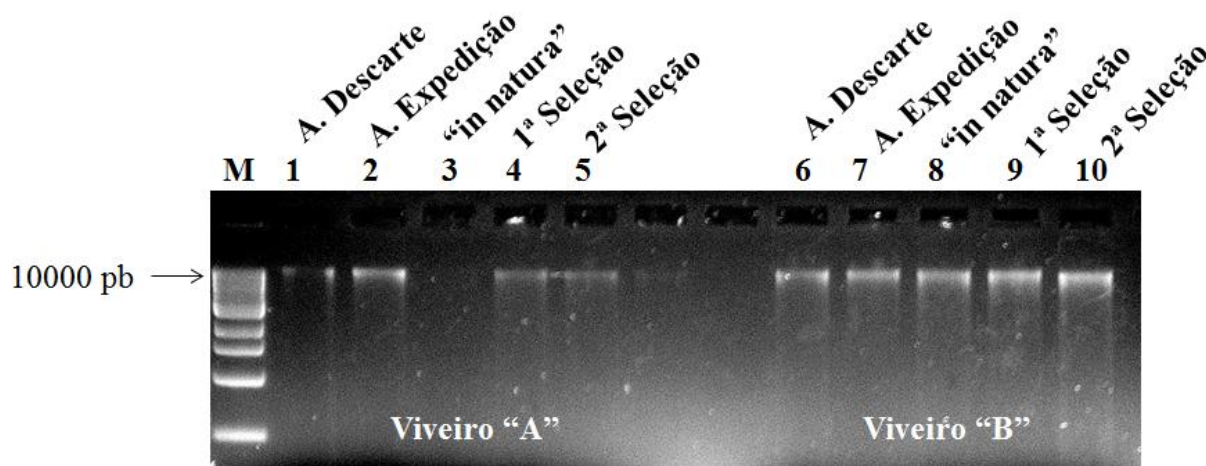
### 3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A partir das imagens dos géis obtidos após as PCR e após as reações PCR-RFLP, duas planilhas de dados binários foram obtidas. A primeira delas foi composta pelos dados de amplificação por meio da PCR e uma segunda foi produzida com base nos resultados das clivagens enzimáticas por PCR-RFLP. Com base na matriz binária foi calculada uma matriz de dissimilaridade de Jaccard e, a partir da matriz de dissimilaridade, produziu-se um dendrograma pelo método UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”). Todas as análises estatísticas foram efetuadas com auxílio do programa R, versão 3.3.1 (2016-06-21) - “Bug in Your Hair” (R Core Team, 2016).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA DO SUBSTRATO

Os procedimentos de extração de DNA genômico mostraram-se eficientes para todas as amostras, exceto a amostra 3, que apresentou quantidade de DNA insuficiente para ser visível em gel (Figura 2).



**Figura 2** - Perfil eletroforético, em gel de agarose a 0,8%, de amostras de DNA genômico extraídas de micro-organismos presentes em amostras de substrato para produção em mudas de eucalipto. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). (1 e 6). Substrato velho na área de descarte; (2 e 7) área de expedição/3ª seleção; (3e 8) substrato *in natura* pronto para uso; (4 e 9); substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); (5 e 10) substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).

É possível observar na imagem (Figura 2) bandas definidas, mostrando que a extração forneceu uma concentração aceitável de DNA, principalmente para as amostras do viveiro "b". Nota-se uma considerável diferença entre as concentrações de DNA obtidos entre as fases e amostras de substrato. Essa diferença pode ser atribuída aos diferentes tipos de amostras, bem como ao estado de técnicação nas diferentes fases e as composições físicas, químicas e principalmente biológicas, que podem ter influência no rendimento e qualidade do material obtido. A presença de matéria orgânica favorece o aumento da microbiota apresentando uma maior massa de DNA.

Poucos são os estudos que relatam a extração de DNA genômico em substrato de planta. Metodologias usadas em amostras de solo foram adaptadas por Gonçalves et al. (2013), que verificaram a presença de DNA em amostras de substrato descartadas por meio da metodologia descrita por Hardeman e Sjolting (2007). No presente estudo, utilizou-se o FastDNA® SPIN Kit for soil (MP Biomedicals), com algumas adaptações( quantidade do material e tempo de lisagem), que foram crucias para determinar a quantidade necessária de DNA total suficiente para os

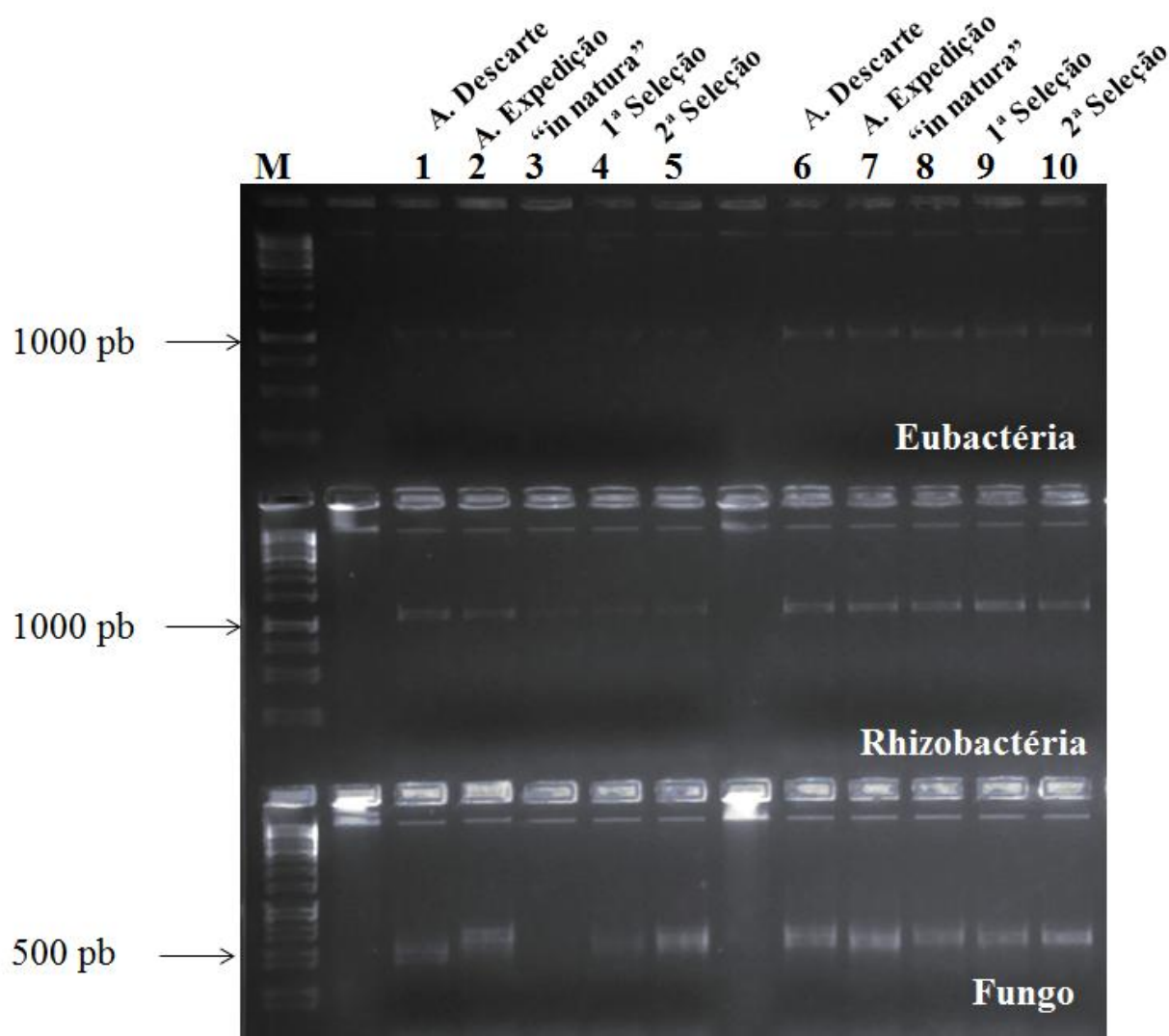
procedimentos posteriores. Diversos estudos relatam o uso de conjuntos de reagentes comercial para extração de DNA em diversos ambientes (Dimitrov 2009; Monteiro 2007; Kolawole et al., 2015; Guida et al., 2014; Chambers et al., 2016).

#### 4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

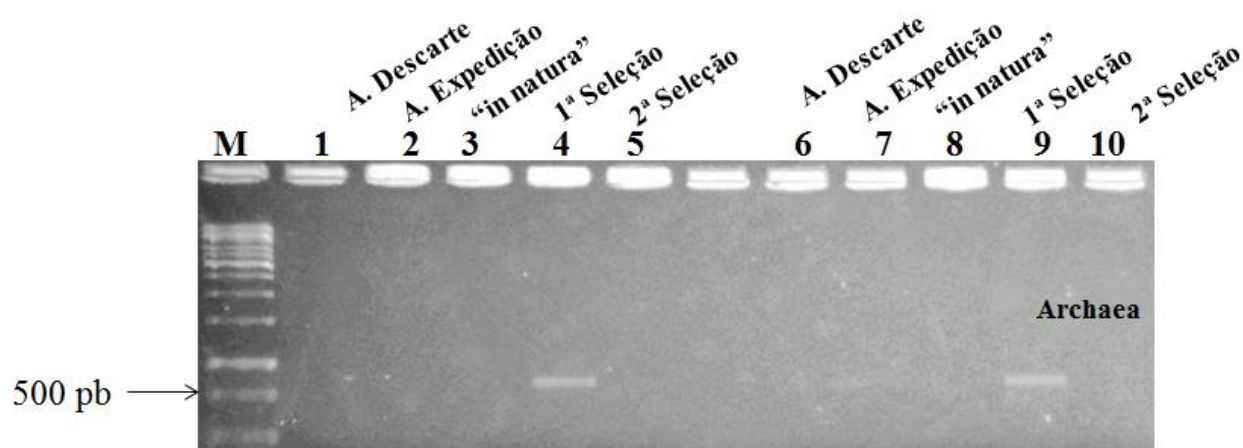
As análises de PCR com os pares de oligonucleotídeos 63f/1087r (Eubactéria)), Ar3f/AR927r (Archaea), 63f/Rhiz-1244r (Rhizobactéria) e ITS1f/ITS4r (Fungo) mostraram-se eficientes para amplificar a região de interesse do gene rDNA bacteriano 16S e rDNA ITS. As amplificações com eubactéria e fungo apresentaram amplificações com tamanho igual a 1000 e 500 pb, respectivamente (Figura 3). Os iniciadores para Eubactéria mostra todas as bandas em uma mesma altura (1.000 pb), enquanto para fungo apresenta uma falha (amostra 3) e duas bandas menores que as demais (amostras 1 e 4), todas de um mesmo viveiro (Figura 3). Quando se utilizaram oligonucleotídeos iniciadores específicos para Archaea houve amplificação somente para as amostras 4 e 9 (substrato 1ª seleção, 35 a 45 dias), uma de cada viveiro (Figura 4). Uma vez que somente duas amostras amplificaram, o resultado da PCR foi excluído das análises PCR-RFLP. Para os fragmentos genômico amplificados com Rhizobactéria, apresentaram amplicons em todas as fases, com fragmentos na altura de 1.000 pb (Figura 3).

As amostras *in natura* utilizadas como padrão apresentou amplificação para Eubactéria, Rhizobactéria e Fungo para o viveiro “B”, e para a Rhizobactéria, para o viveiro “A” (Figura 3). Assim, pode-se supor que a amostra *in natura* proveniente do viveiro “A” não possui fungos e nem Archaea e que a amostra *in natura* proveniente do viveiro “B” não possui Archaea.

A presença de bandas em quase todas as amostras e, logo, quase todas as fases de produção estudadas, pode indicar uma relativa diversidade microbiológica nas mesmas. Ou seja, há micro-organismos em todas elas (Figuras 3 e 4). Por outro lado, ausência de amplificação em algumas amostras, possivelmente, pode ser devido à ausência de micro-organismos que aqueles pares de oligonucleotídeos detectariam ou, ainda, devido à presença de contaminantes provenientes da matéria orgânica em decomposição, como ácidos húmicos (ANDERSON e CAIRNEY, 2004). Mas, considerando que essas mesmas amostras amplificaram com outros pares de iniciadores, a primeira suposição é a mais plausível, em que pese os ácidos húmicos serem reconhecidos como fortes inibidores da PCR e de poderem ser co-extraídos aos ácidos nucleicos (JACOBSEN, 1995; KREADER, 1996; SORCI et al., 1999; WINTZINGERODE et al., 1997).



**Figura 3** - Imagem de gel de agarose à 1,5% contendo produtos de PCR. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria (produto de PCR com os iniciadores 63f/1087r); Rhizobactéria (produto da PCR utilizando os iniciadores 63f/Rhiz1244r); Fungo (produto da PCR utilizando os iniciadores ITS1f/ITS4r). Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de substrato área de expedição/3ª seleção; 3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).



**Figura 4** - Imagem de gel de agarose à 1,5% contendo produtos de PCR. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Archaea- Produto de PCR utilizando iniciadores Ar3f/AR927r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de substrato área de expedição/3ª seleção; 3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).

Diversos estudos de determinação da diversidade microbiológica têm empregado a amplificação do DNA pela técnica de PCR com oligonucleotídeos específicos, que tem como função amplificar regiões altamente conservadas e repetidas, normalmente no espaço intergênico. O uso desses oligonucleotídeos específicos é vantajoso sobre aqueles não específicos porque, em uma única reação, obtém-se um número elevado de bandas, permitindo a detecção de polimorfismo suficientemente elevado para a análise genética da diversidade de micro-organismos (CHUEIRE et al., 2000) em uma dada amostra.

Mas, os resultados das análises por meio da técnica de PCR não possibilitou uma grande quantidade de polimorfismos. Ou seja, a maioria das amostras apresentou um mesmo tamanho de banda quando amplificada por um mesmo par de iniciadores. Todavia, não é possível dizer que estas amostras são iguais ou que elas possuem os mesmo micro-organismos, uma vez que sequências de DNA de um mesmo tamanho podem ser constituídas por nucleotídeos distintos. Logo, uma outra técnica que considera a composição da sequência de DNA deve ser empregada nestas amostras a fim de verificar se elas são ou não iguais quanto a constituição nucleotídica. Por outro lado, os resultados obtidos com a PCR garantem que as amostras 4 e 9, provavelmente, possuem Archaea, a amostra 3 do viveiro "A" não possui fungos e que as amostras 1 e 4 possuem fungos distintos dos fungos presentes nas amostras 2 e 5, para o viveiro "A".



### 4.3 ANÁLISE DE POLIMORFISMO POR MEIO DE PCR-RFLP

Uma vez que as PCR não propiciaram a identificação de diferenças proeminentes entre as amostras, a técnica de PCR-RFLP foi utilizada para confirmar ou não aqueles resultados. Assim, os produtos da PCR foram submetidos à clivagem com as enzimas de restrição *Hae*III, *Bam*HI, *Taq*I e *Hind*III. As enzimas de restrição reconhecem e atuam sobre sequências específicas de DNA, catalisando ligações fosfodiéster entre dois nucleotídeos consecutivos ligados a determinadas bases nitrogenadas (SWEENEY e DOBSON, 1998). Dessa forma, se houver alguma diferença no conteúdo de nucleotídeos do sítio de reconhecimento da enzima, não haverá clivagem do DNA naquela região. Observa-se que as reações de clivagem produziram uma quantidade maior e mais variável de fragmentos entre as diferentes amostras analisadas (Figuras 5, 6, 7 e 8).

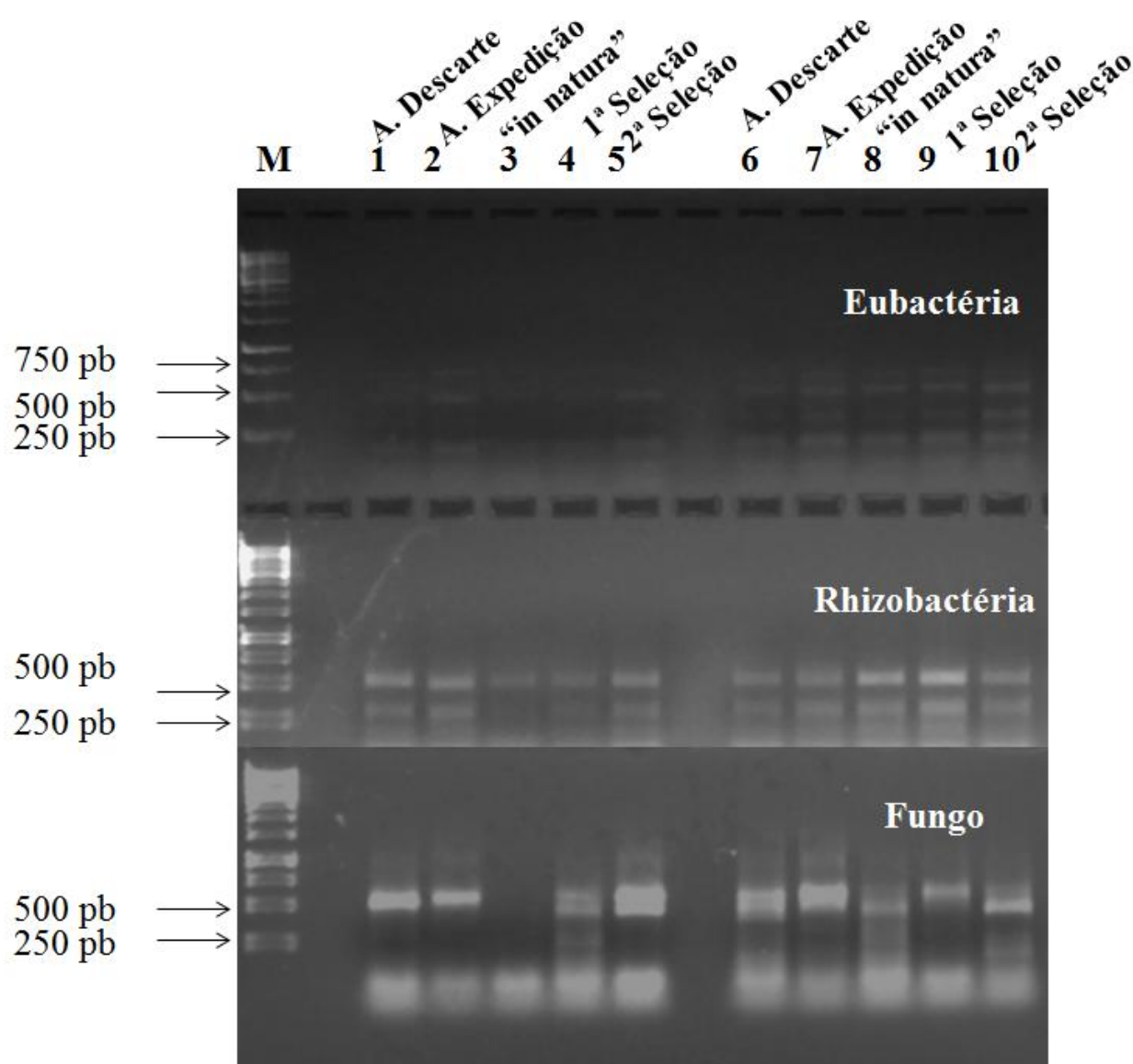
A enzima *Hae*III gerou fragmentos entre 250 e 750 pb, aproximadamente nos produtos da PCR obtidos com Eubactéria (Figura 5). Observa diferenças entre várias amostras, demonstrando que, apesar de a PCR ter amplificado fragmentos de DNA de um mesmo tamanho, a constituição desses fragmentos são diferentes e denotam a presença de diferentes micro-organismos, especificamente, diferentes tipos de Eubactérias. Quando se analisa a clivagem nos produtos da PCR obtidos com Rhizobactéria (Figura 5), essa enzima produziu fragmentos entre 250 e 500 pb. Do mesmo modo que o anterior, também é possível verificar diferenças entre as amostras, indicando haver diferentes tipos de Rhizobacteria nestas amostras. Por sua vez, a clivagem dos produtos da PCR obtidos Fungo (Figura 5 ) apresentou as diferenças mais proeminentes, indicando haver uma diversidade bem distinta de fungos entre as amostras de substrato.

Já a enzima *Bam*HI produziu polimorfismos somente entre as amostras cujos iniciadores eram específicos para fungos (Figura 6 C). As amostras polimórficas foram oriundas do viveiro “A”

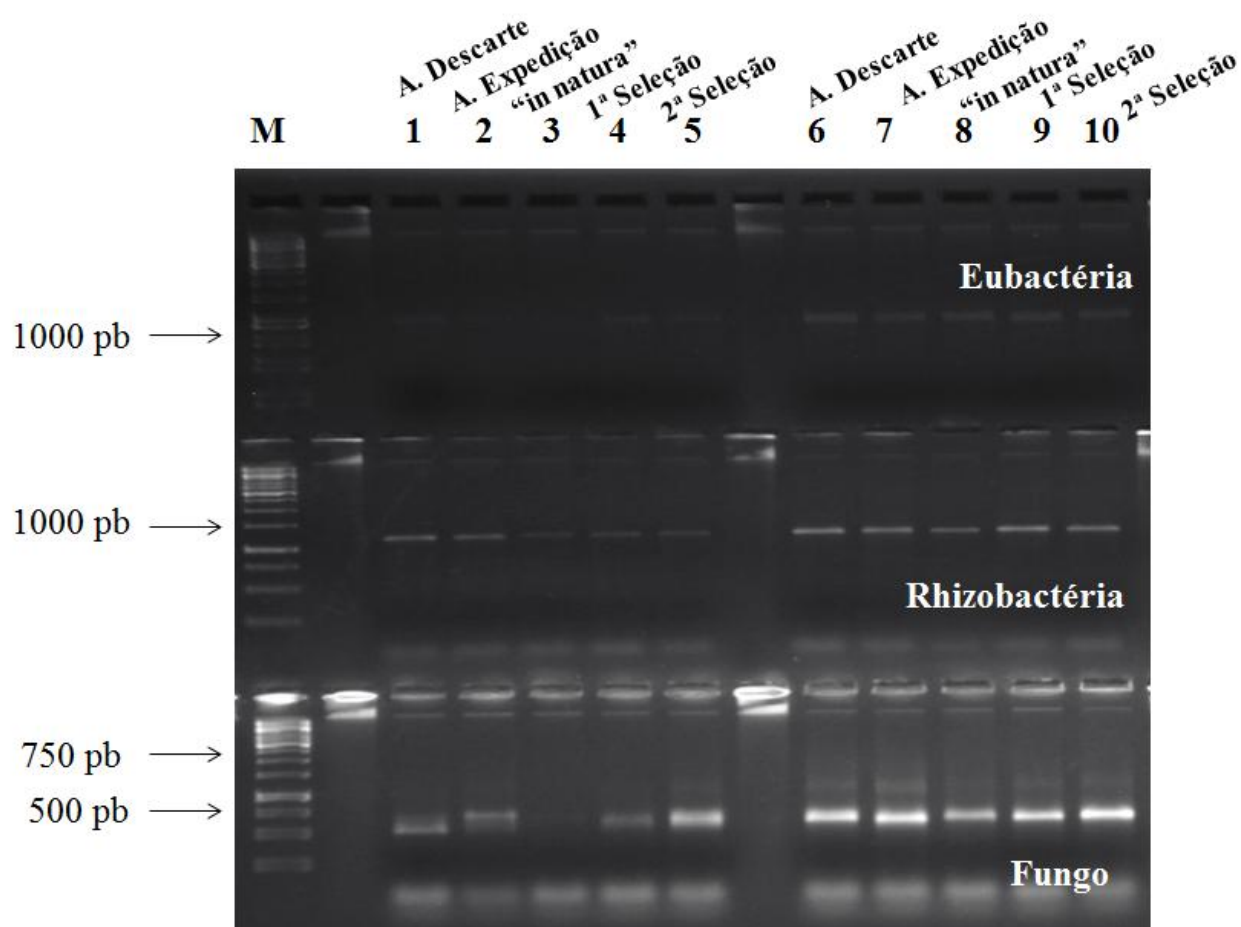
Com a enzima *Taq*I foi possível verificar que as amostras 6 (Figura 7) e as amostras 1 e 3 (Figura 7 ) diferem das demais quanto à presença de Rhizobacteria e fungos, respectivamente.

Por fim, os polimorfismos gerados pela enzima *Hind*III foram bem escassos (Figura 8). A mais fácil de visualizar é a diferença apresentada pelas amostras 1, 3 e 6 para fungos (Figura 8).

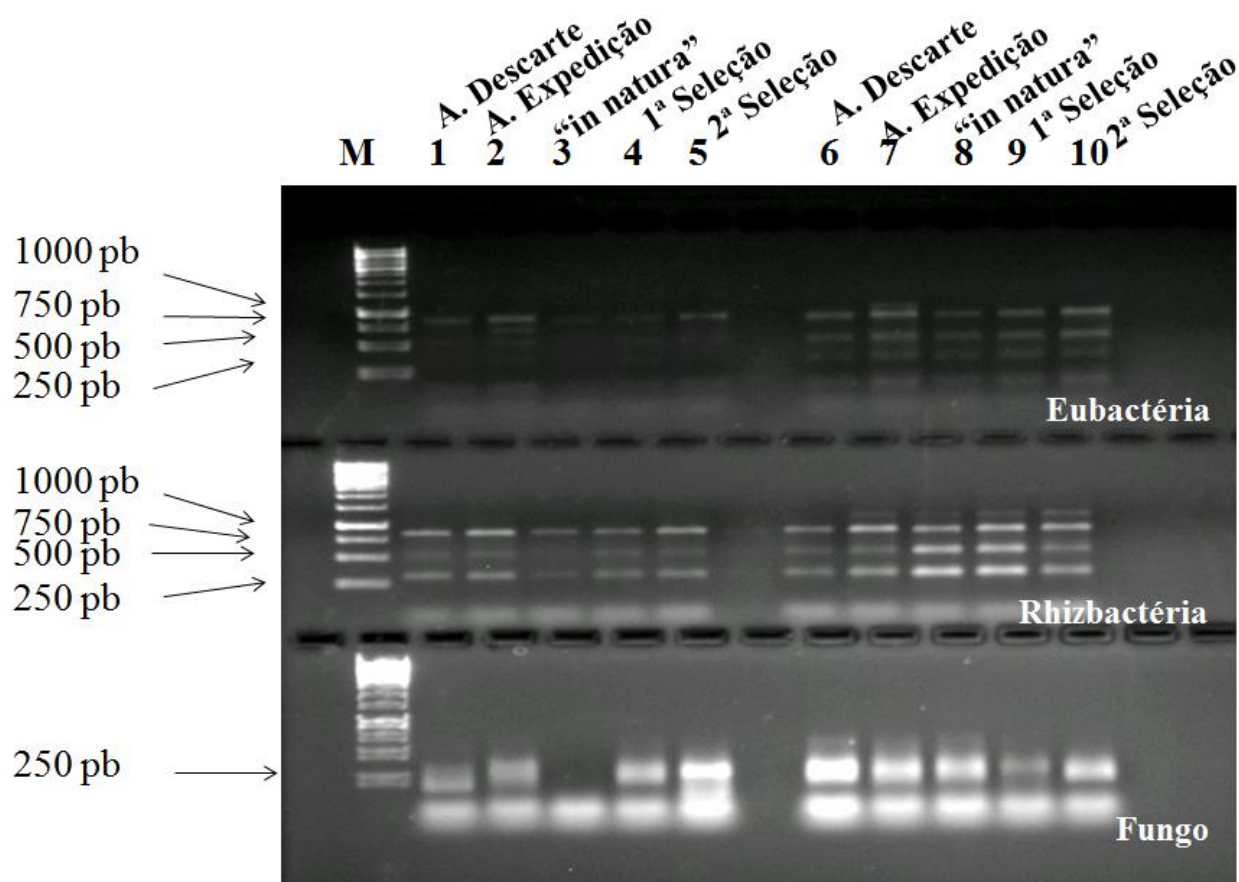




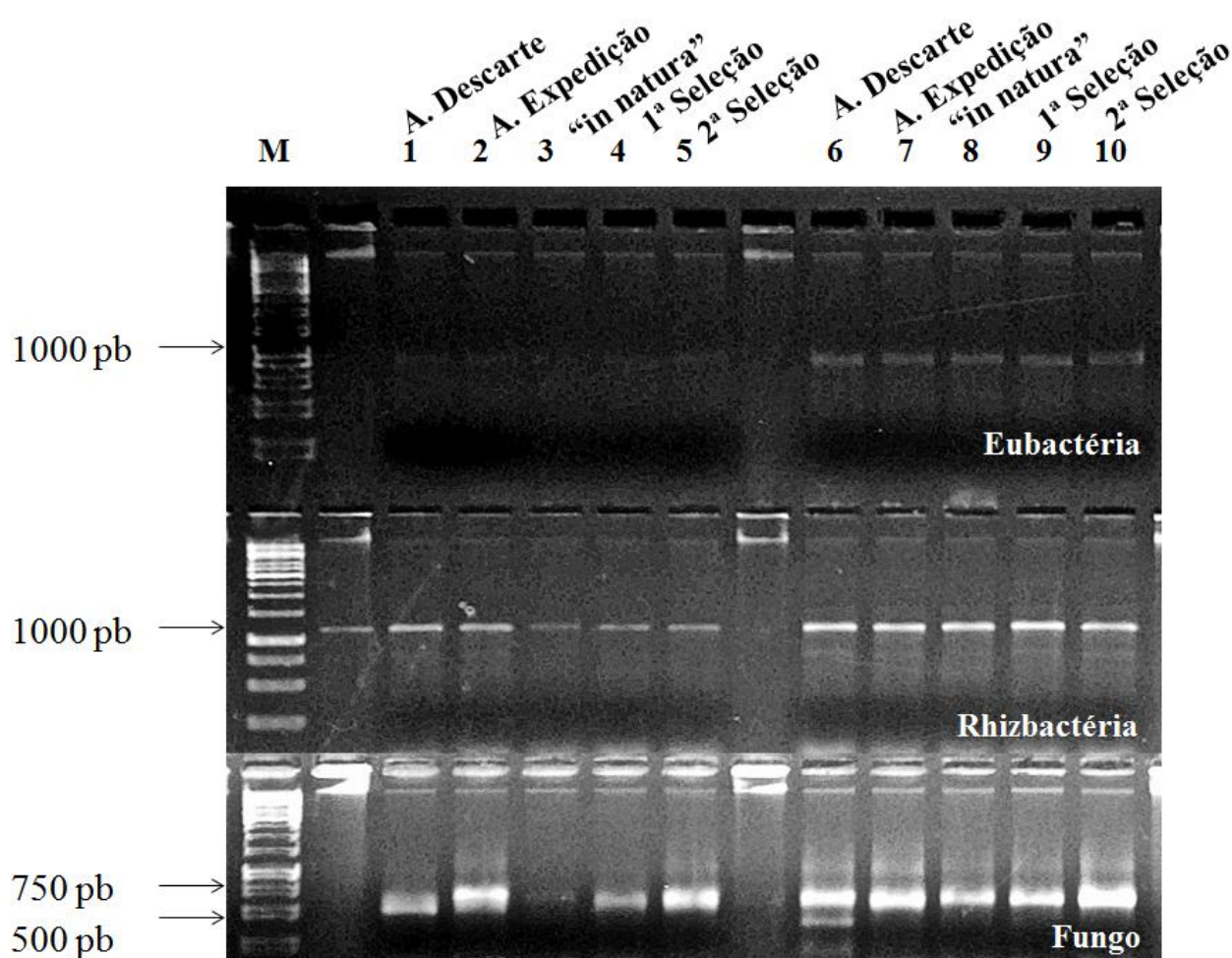
**Figura 5** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *HaeIII*. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria - iniciadores 631087r; Rhizobactéria - iniciadores 63f/Rhiz 1244r; Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).



**Figura 6** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *Bam*HI. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria iniciadores 63f/1087r; Rhizobactéria- iniciadores 63f/Rhiz 1244r; Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).



**Figura 7** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *TaqI*. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria - iniciadores 63f/1087r; Rhizobactéria- iniciadores 63f/Rhiz 1244r; (C) – Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).



**Figura 8** - Imagem de gel de agarose à 1,5% após eletroforese de amostras da análise PCR-RFLP das amostras de substrato gerados pela clivagem da enzima de restrição *Hind*III. (M) Marcador de tamanho 1 Kb DNA Ladder (Termo Scientific); Eubactéria - iniciadores 63f/1087r; Rhizobactéria - iniciadores 63f/Rhiz 1244r; Fungo - iniciadores ITS1f/ITS4r. Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "A" (1, 2, 3, 4 e 5); Amostras de substratos coletados em viveiro da empresa "B" (6, 7, 8, 9 e 10). 1 e 6 – amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 – amostras de área de expedição/3ª seleção; (3 e 8 – amostras de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 – amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 – amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).

A técnica de PCR-RFLP vem sendo utilizada em análise da diversidade microbológica em diversos ambientes. Mas, é importante considerar algumas limitações quando a utilizamos para o estudo da diversidade microbológica em amostra de substrato. Alguns micro-organismos representativos podem não ser detectados pela PCR que antecede a clivagem e, logo, as bandas observadas no gel podem representar as espécies mais abundantes na amostra (SMIT et al., 1999). Bandas provenientes de micro-organismos diferentes podem possuir a mesma mobilidade eletroforética, ocupando a mesma posição no gel. Porém, uma banda detectada no gel pode

representar mais de um genótipo, com sequências divergentes (GOMES et al., 2003). Outra limitação é que um mesmo micro-organismo pode gerar múltiplas bandas no gel de RFLP, devido à heterogeneidade da região amplificada pela PCR (VAINIO e HANTULA, 2000). Ou seja, pode-se ter como alvo uma região hipervariável.

Portanto, a PCR-RFLP pode ser mais adequada quando o objetivo é conduzir um estudo comparativo de amostras distintas. Se as amostras exibirem padrões de bandas diferentes, certamente as comunidades microbianas apresentam diferenças. Caso o padrão de bandas seja igual, então, estas diferenças podem estar presentes ou não, havendo a necessidade de confirmar os resultados por outras metodologias (LAMBAIS et al., 2005). Karkouri et al (2004) utilizaram a técnica de PCR-RFLP para verificar a diversidade de ectomicorrizas em mudas de pinus em condições de viveiro. Miao et al (2013) analisaram a diversidade de bactéria que degradam o fitato no Platô Tibetano, enquanto Roesch et al (2007) analisaram a diversidade de bactéria diazotróficas endofítica em plantas de milho.

A análise de agrupamento hierárquico, em função da presença e da ausência de bandas detectáveis em todas as amostras de substrato, apresenta, claramente, três grupos bem distintos (Figura 9). Um grupo é formado pela amostra 3, substrato *in natura* proveniente do viveiro “A”, outro contém as demais amostras provenientes do viveiro “A” e o terceiro contém todas as amostras provenientes do viveiro “B”. Observa-se que as amostras do viveiro “B” são muito mais homogêneas entre si, enquanto as amostras do viveiro “A” são muito mais heterogêneas. Essa diferença entre os viveiros pode ser devido a fatores abióticos, tais como umidade e temperatura, que podem estar influenciando a presença de micro-organismo nas diferentes fases e entre os substratos.



**Figura 9** - Agrupamento das amostras de substrato obtido por meio do método UPGMA aplicado sobre a matriz de dissimilaridade de Jaccard. 1 e 6 amostras de substrato velho na área de descarte; 2 e 7 amostras de substrato área de expedição/3ª seleção; 3 e 8 amostra de substrato *in natura* pronto para uso; 4 e 9 amostras de substrato 1ª seleção (35 a 45 dias); 5 e 10 amostras de substratos 2ª seleção (60 a 70 dias).

A similaridade em nível de diversidade entre os dois grupos é menor que 0,06%. As amostras organizadas em subgrupos nas diferentes fases de produção apresentam similaridades entre 0,06 e 0,67%, indicando que há diferença na composição de micro-organismos que se propagam nesses substratos. Essa situação é mais evidente nas amostras 1, 2, 4 e 5.

A grande dissimilaridade da amostra 3 em relação às demais pode se dar ao fato de que as amostras *in natura* deve se apresentar livre de micro-organismos, quase estéreis. Logo, esse tipo de amostra tende a ter uma menor diversidade de micróbios.

A detecção de grupos a partir das amostras de substratos analisadas infere que o número de fragmentos obtidos em cada amostra reflete uma certa diversidade microbiológica constituída por fungos, eubactéria e Rhizobacteria. As diferenças detectadas entre as amostras, entre as fases de produção e entre os dois viveiros mostra que os diferentes tipos de substrato, a composição, características, fase de produção, são fatos a serem relevados quanto ao reaproveitamento ou não de substrato.

Contudo o uso da ferramenta de PCR-RFLP foi útil para confirmar a presença da diversidade de micro-organismo em amostra de substratos. No entanto os dados não permite inferir sobre a fitopatogenicidade ou não dos micro-organismos. No entanto, com está abordagem

polifásica, será possível obter maiores informações em estudos da biodiversidade para compreender a diversidade de micro-organismos em substratos.

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ A técnica de PCR-RFLP foi satisfatória para detecção da diversidade microbológica em amostras de substrato;
- ✓ Existem diferenças entre os dois viveiros analisados quanto à diversidade de micro-organismos presentes nos substratos;
- ✓ As diversas fases de produção em decorrência do tempo favorecem a proliferação de micro-organismos no substrato, bem como a diversidade dos mesmos;
- ✓ As características físicas, químicas e biológicas, bem como os fatores abióticos influenciam diretamente na diversidade microbológica entre as fases do processo de produção de mudas.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU MF; ABREU CA; BATAGLIA O C.. Uso da análise química na avaliação da qualidade de substratos e componentes. In: Encontro nacional sobre substrato para plantas, **Anais...**, Campinas: Instituto Agrônômico, 2002.
- ALFENAS, A. C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. Viçosa: UFV, 2004.
- ALFENAS, A.C. et al. **Clonagem e doenças do eucalipto**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2009.
- AMANN, R.I.; Ludwig, W.; Schleifer, K.H. **Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation**. Microbiological Reviews, v.59, 1995.
- ANDERSON, I. C.; CAIRNEY, J. W. G. **Diversity and ecology of soil fungal communities: increased understanding through the application of molecular techniques**. Environmental Microbiology, Oxford, v.6, p.769-779, 2004.
- ANTONIOLLI, Z.I.; SCHACHTMAN, D.; OPHELKELLER, D.; SMITH, S.E. Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. Mycological Research, Amsterdam, v.104, 2000.
- ASSIS, T. F. Propagação vegetativa de *Eucalyptus* por microestaquia. In: IUFRO CONFERENCE ON SILVICULTURE AND IMPROVEMENT OF EUCALYPTS, 1997, Salvador. **Proceedings...** Colombo: EMBRAPA, 1997.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CELULOSE E PAPEL: dados do setor**. 2016. BRACELPA. São Paulo, p.28
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES DE FLORESTA PLANTADAS**. Anuário estatístico da ABRAF 2013 - ano base 2012 /ABRAF. – Brasília: 2013.
- BALINI, L.C. et al. **Identificação pela técnica de PCR-RFLP, de *Aspergillus* spp. Isolados de grãos de soja e milho**. Revista Brasileira de Energia Renováveis, v. 4, 2015.
- BEARE, M.H. et al. **A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling**. Plant Soil, v. 170, 1995.
- BEZERRA, F. C.; BEZERRA, G. S. S. **Efeito do substrato na formação de mudas de meloeiro (*Cumumis melo*)**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2000.
- BOOMAN, J. Evolução dos substratos usados em horticultura ornamental na Califórnia. In: Kämpf, A.N. e Fermino, M.H. (ed.) **Substrato para plantas, a base da produção vegetal em recipientes**. Porto Alegre: Gênese, 2000.
- BRASIL. Decreto nº 5.153 de 23 de julho de 2004. Aprova o Regulamento da Lei nº 10.711, de 5 de agosto de 2003, que dispõe sobre o Sistema Nacional de Sementes e Mudas - SNSM, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 26 de julho de 2004.

- CARNEIRO, J. G. A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR: FUPEF, 1995.
- CHAMBERS, L.G. et al. **Effects of Salinity and Inundation on Microbial Community Structure and Function in a Mangrove Peat Soil**. Society of Wetland Scientists, 2016.
- CHO, J.; KIM, S. **Increase in bacterial community in subsurface aquifers receiving livestock wastewater input**. Applied and Environmental Microbiology, v. 66, 2000.
- CHUEIRE, L. M. O. et al. **Classificação taxonômica, baseada na caracterização molecular, das estirpes de rizóbio recomendadas para as culturas da soja e do feijoeiro**. Londrina: Embrapa – Soja, 2000.
- COUTINHO, H. L. C. et al. Evaluating the microbial diversity of soil samples: methodological innovations. **Anais...** Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 71, 1999.
- CUNHA, A.M. et al. **Efeito de diferentes substratos sobre o desenvolvimento de mudas de *Acacia* sp.** Revista Árvore, Viçosa, v.20, 2006.
- DAMS, E. et al. **Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences**. Nucleic Acids Res., v. 16, 1988.
- DESTRO, M.T. ***Listeria monocytogenes*, em camarão (*Penaeus brasiliensis*): marcadores sorológico e genéticos no monitoramento de sua disseminação em uma unidade processada de pescado**. 142 f. Tese (Doutorado em Ciência de alimento) – Universidade de São Paulo, 1995.
- DIMITROV, M.R. **Construção de biblioteca metagenômica e prospecção de genes para a síntese de polihidroalcanoatos**. 100f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)-Universidade de São Paulo/Instituto Butantan, São Paulo, 2009.
- DUARTE, D. M.; NUNES, U. R. **Crescimento inicial de mudas de *Bauhinia forficata* Link em diferentes substratos**. Cerne, Lavras, v.18, 2012.
- DUTRA, T. R. **Crescimento e nutrição de mudas de copaíba em dois volumes de substratos e níveis de sombreamento**. 45f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2010.
- ELEY, A. **New Molecular Methods for the Detection of Bacteria in Food**. Nutrition e Food Science, v.93, 1993.
- FARIA, J.M.R.C. **Severidade e controle da bacteriose foliar em mudas de *Eucalyptus urophylla* x *Eucalyptus grandis* em função do nível tecnológico do viveiro**. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP – Campus de Botucatu, Botucatu, 2013.
- FIRMINO, M.H.; KAMPF, A.N. **Densidade de substratos dependendo dos métodos de análise e níveis de umidade**. Horticultura brasileira, v.30, 2012.

FREITAS, A.F.; FREITAS, A. F.; FREITAS, A.F. **Caracterização dos Viveiros Florestais de Viçosa, Minas Gerais: um estudo exploratório.** Desenvolvimento em questão, 2013.

GERBI, S.A. **Evolution of ribosomal DNA.** In: MCINTYRE, R.E. Molecular evolutionary genetics. New York: Plenum, 1985.

GOMES, E.A.; KASUYA, M.C.M.; BARROS, E.G.; BORGES, A.C. **Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi.** Genetics and Molecular Biology, São Paulo, v.25, 2002.

GONÇALVES, J.F. et al. **Genomic DNA of Microorganisms Extracted from Substrates in Forest Nurseries.** Australian Journal of Basic and Applied Sciences, v. 9, 2013.

GONÇALVES, J.L.M. et al. Produção de mudas de espécies nativas: substrato, nutrição, sombreamento e fertilização. In: **Nutrição e fertilização florestal.** Piracicaba: IPEF, 2000.

GUIDA, M. et al. **Microbial diversity of landslide soils assessed by RFLP and SSCP fingerprints.** J. Appl Genetics, v. 55,., 2014.

HARDEMAN, F.; SJOLING, S. **Metagenomic approach for the isolation of a novel low-temperature-active lipase from uncultured bacteria of marine sediment.** Fems Microbiology Ecology, v.59, 2007.

HEAD, I. M.; SAUNDERS, J. R.; PICKUP, R. W. **Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms.** Microb. Ecol. v. 35, 1998.

HILLIS, D.M.; DIXON, M.T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. Quartely Review of Biology, Ithaca, v. 66, 1991.

**INDÚSTRIA BRASILEIRA DE ÁRVORES.** Relatoria ano base 2014. Brasília: IBÁ, 2015.

JACOBSEN, C.S. **Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplifications assay.** Applied and Environmental Microbiology, v. 61, 1997..

KAMPF, A.N. Materiais regionais como alternativa ao substrato. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE SUBSTRATOS PARA PLANTAS - Materiais Regionais como substrato, 6, 2008, Fortaleza. **Anais eletrônicos...** Fortaleza: Embrapa Agroindústria, Tropical SEBRAE /CE e UFC, 2008.

KAMPF, A.N. O uso de substrato em cultivo protegido no agronegócio brasileiro. In: FURLANI, A.M.C. et al. (Coord.). **Caracterização, manejo e qualidade de substratos para produção de plantas.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2002.

KAMPF, A.N., Produção comercial de plantas ornamentais. Guaíba: Livraria e editoria agropecuária, 254 p, 2000.

KARKOURI, K. E. et al. **Diversity of ectomycorrhizal fungi naturally established on containerised Pinus seedlings in nursery conditions.** Microbiological Research, v. 160, 2005.

KIRK, J. L. et al. **Methods of studying soil microbial diversity.** Journal of Microbiological Methods, v. 58, 2004.

KOLAWOLE, R.M. et al. **Genetic Diversity of Internal Transcribed Spacer Region of Filamentous Fungi Isolated from Wheat in Lagos State, Nigeria.** International Journal of Genetics, v. 5, 2015.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 5.ed. Rio de Janeiro: MEDSi, 2001.

KRATZ, D. **Substratos renováveis na produção de mudas de *Eucalyptus benthamii* Maiden et Cambage e *Mimosa scabrella* Benth.** 120 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

KREADER, C. A. **Relief of amplification inhibition in PCR with bovine serum albumin or T4 gene 32 protein.** Applied and Environmental Microbiology, v. 62, 1996.

LAMBAIS, M. R et al. Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. In: VIDALTORRADO, P.; ALLEONI, L. R. R.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 4, 2005.

MAFIA, R.G. et al. **Critério técnico para determinação da idade ótima de mudas de eucalipto para plantio.** Revista Árvore, Viçosa, v. 29, 2005.

MALORNY, B. et al. **Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: towards an international standard.** Appl. Environ. Microbiol., v. 69, 2003.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Indicadores e estatísticas. Brasília, 2009. Disponível em: <[www.agricultura.gov.br](http://www.agricultura.gov.br)>. Acesso em: 10.06 2016.

MESQUITA, R. A et al. **Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR.** Pesquisa Odontológica Brasileira, São Paulo, v. 15, 2001.

MIAO, Y. Z. et al. **PCR–RFLP analysis of the diversity of phytate-degrading bacteria in the Tibetan Plateau.** Can. J. Microbiol. v. 59, 2013.

MONTEIRO, G.G. **Análise da comunidade de fungos em solos da Amazônia por eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE).** 48f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo.** 2 ed. Lavras: Editora UFLA, 2006.

MULLIS, K.; FALOONA, F. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction.** Methods Enzymol., v. 155, 1987.

MYBURG, A.A. et al. **The genome of *Eucalyptus grandis***. Nature, London, v. 510, 2014.

NAKATSU, C.H. **Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis**. Soil Science Society of America Journal, v. 71, 2007.

OLIVEIRA, F.F.P. **Reutilização de substrato proveniente da produção de mudas: extração de DNA genômico de micro-organismos, desinfestação e qualidade de muda**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2014.

PACE, N.R. **A molecular view of microbial diversity and the biosphere**. Science, v. 276, 1997.

PARRA-O C. et al. **Phylogeny, major clades and infrageneric classification of *Corymbia* (Myrtaceae), based on nuclear ribosomal DNA and morphology**. Australian Systematic Botany, v. 22, 2009.

POTTS, B.M.; DUNGEY, H.S. **Interspecific Hybridisation of *Eucalyptus*: key issues for breeders and geneticists**. New Forests. Amsterdam, v.27, 2004.

QUEIROZ, L. R. S.; BARRICHELLO, L. E. G. **O eucalipto: um século no Brasil 1908- 2008**. São Paulo: Antônio Belline, 2007.

RIETH, S. **Desinfestação de substratos e fungos micorrízicos na produção de porta-enxertos de citros**. 104f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

ROESCH, L.F.W. et al. **Diversidade de bactérias diazotróficas endofíticas associadas a plantas de milho**. Revista Brasileira de Ciência do solo, v. 31, 2007.

ROSADO, A. S. Diversidade e ecologia de microrganismos do solo. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE FERTILIDADE E NUTRIÇÃO DE PLANTAS, 23; REUNIÃO BRASILEIRA SOBRE MICORRIZAS, 7; SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICRO-BIOLOGIA DO SOLO, 5; REUNIÃO BRASILEIRA DE BIOLOGIA DO SOLO, 2, 2000, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2000. CD-ROM.

ROSSELÓ-MORA, R.; AMMAN, R. **The species concept for prokaryotes**. FEMS Microbiology Review, v.25, n.1, 2001.

ROTUREAU, B.; CATZEFLIS, F.; CARME, B. **Short report: Absence of *Leishmania* in Guianan bats**. American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene, v.74, 2006.

SANTO, C.B. et al. **Efeito do volume de tubetes e tipos de substratos na qualidade de mudas de *Cryptomeria japonica* (L.f.) d. don**. Ciência Florestal, v.10, 2000.

SCHLOTTERER, C. et al. **Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in *Drosophila***. Molecular Biology and Evolution, Oxford, v.11, 1994.

SCHORN, L. A.; FORMENTO, S. **Silvicultura II: Produção de Mudas Florestais**. Universidade Regional de Blumenau Centro de Ciências Tecnológicas Departamento de Engenharia Florestal (Caderno didático), 2003.

SINGH, B.K. et al. **Use of multiplex terminal restriction fragment length polymorphism for rapid and simultaneous analysis of different components of the soil microbial community**. Applied and Environmental Microbiology, v. 72, 2006.

SMIT, E. et al. **Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis**. Applied and Environmental Microbiology, v. 65, 1999.

SORCI, J.J.; PAULAUSKIS, J.D.; FORD, T.E. **16S rRNA restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial diversity as a biomarker of ecological health in polluted sediments new Bedford harbor, Massachusetts, USA**. Marine Pollution Bulletin, v. 38, 1999.

STURSA, P. et al. **Approaches for diversity analysis of cultivable and noncultivable bacteria in real soil**. Plant Soil and Environment, v. 55, 2009.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. **Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species**. International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v. 43, 1998.

TIEDJE, J. M. et al. Soil teeming with life: new frontiers for soil science. In: REES, R. M. et al. (Org.). Sustainable management of soil organic matter. **Wallingford: CAB International**, 2001.

TITON, M. **Propagação clonal de *Eucalyptus grandis* por miniestaquia e microestaquia**. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

TORSVIK, V. et al. **Novel techniques for analyzing microbial diversity in natural and perturbed environments**. Journal of Biotechnology, v. 64, 1998.

TORSVIK, V.; OVREAS, L. **Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems**. Current Opinion in Microbiology, v. 5, 2002.

VAINIO, E. J.; HANTULA, J. **Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA**. Mycological Research, v. 104, 2000.

VAN DIJK, H.E.; VAN DER BOON, J. **Standardization of potting soils in the Benelux**. Acta Horticulturae, Leuven, 1971.

VENTURIN, N. et al. Histórico. In: **Eucaliptocultura no Brasil: silvicultura, manejo e ambiência**. Viçosa: SIF, 2014.

VOLPINI, A. C. et al. **PCR-RFLP to identify *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (Leishmania) amazonensis* causing American cutaneous leishmaniasis**. Acta Tropica, v. 90, 2004.

WENDLING, I; GATTO, A. **Substratos, adubação e irrigação na produção de mudas**. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002.

WILSON P. et al. **Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny.** Plant Systematics and Evolution, v. 251, 2005

WINTZINGERODE, F. V.; GOBEL, U. B.; SATCKEBRANDT, E. **Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based r RNA analysis.** Fems Microbiology Reviews, v. 21, 1997.

WOESE, C. R. et al. **Detailed Analysis of the Higher-Order Structure of 16S-Like Ribosomal Ribonucleic Acids.** Microbial Rev, v. 47, 1983.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R.L. **Silvicultura clonal: princípios e técnicas.** Viçosa: UFV, 2009.